



(19) 대한민국특허청(KR)
(12) 공개특허공보(A)

(11) 공개번호 10-2012-0041390
(43) 공개일자 2012년05월02일

(51) 국제특허분류(Int. Cl.)

A61K 31/045 (2006.01) A61K 31/05 (2006.01)

A61P 35/00 (2006.01) A61P 9/00 (2006.01)

(21) 출원번호 10-2010-0102816

(22) 출원일자 2010년10월21일

심사청구일자 없음

(71) 출원인

경희대학교 산학협력단

경기도 용인시 기흥구 덕영대로 1732, 국제캠퍼스 내 (서천동, 경희대학교)

(72) 발명자

김성훈

서울특별시 강남구 언주로30길 56, - E동 2405호 (도곡동, 타워팰리스)

정덕범

서울특별시 동대문구 경희대로3길 37, 103호 (회기동)

이효정

서울특별시 동대문구 회기로12길 48-9, 102호 (회기동)

(74) 대리인

안소영

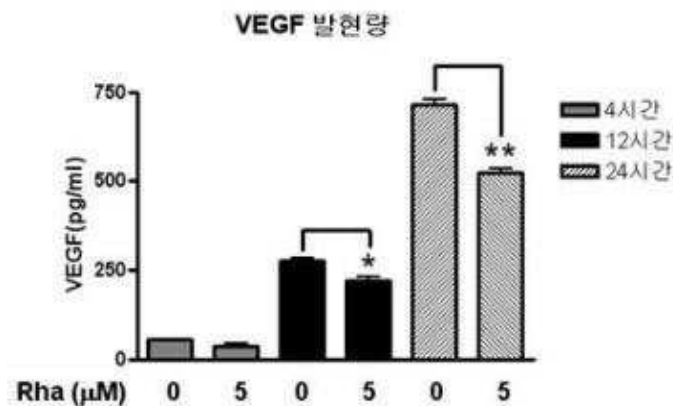
전체 청구항 수 : 총 14 항

(54) 발명의 명칭 신생혈관형성억제, VEGF억제 또는 HIF-1-알파 억제용 조성물

(57) 요약

본 발명은 라폰티게닌을 유효성분으로 함유하는 신생혈관형성억제용 조성물, VEGF 억제용 조성물, HIF-1알파 억제용 조성물, 종양, 황반변성, 당뇨, 당뇨병성 망막병증, 건선, 류마티스성 관절염 또는 만성 염증 등의 치료, 개선 또는 예방용 조성물을 제공한다. 본 발명의 조성물은 함유되는 유효성분에 의해 신생혈관형성억제, VEGF 억제, HIF-1알파 억제, 종양, 황반변성, 당뇨, 당뇨병성 망막병증, 건선, 류마티스성 관절염 또는 만성 염증 등의 치료, 개선 또는 예방에 효과적이라는 장점을 갖는다.

대표도 - 도1



특허청구의 범위

청구항 1

라폰티게닌을 유효성분으로 함유하는 신생혈관형성억제용 조성물.

청구항 2

제1항에 있어서, 상기 신생혈관형성억제제는 저산소 상태에서 유도되는 신생혈관 형성을 억제하는 것인 조성물.

청구항 3

제1항에 있어서, 상기 신생혈관형성억제제는 VEGF(Vascular endothelial growth factor) 억제 또는 HIF-1알파(Hypoxia-inducible factor 1, alpha) 억제 중에서 선택된 하나 이상에 의한 것인 조성물.

청구항 4

제1항에 있어서, 종양, 황반변성, 당뇨, 당뇨병성 망막병증, 건선, 류마티스성 관절염 또는 만성 염증 중에서 선택된 하나 이상의 치료, 개선 또는 예방에 효과적인 조성물.

청구항 5

제1항 내지 제4항 중 어느 한 항에 있어서, 식품 조성물 또는 약학 조성물인 조성물.

청구항 6

라폰티게닌을 유효성분으로 함유하는 VEGF(Vascular endothelial growth factor) 억제용 조성물.

청구항 7

제6항에 있어서, 종양, 황반변성, 당뇨, 당뇨병성 망막병증, 건선, 류마티스성 관절염, 또는 만성 염증 중에서 선택된 하나 이상의 치료, 개선 또는 예방에 효과적인 조성물.

청구항 8

제6항 내지 제7항 중 어느 한 항에 있어서, 식품 조성물 또는 약학 조성물인 조성물.

청구항 9

라폰티게닌을 유효성분으로 함유하는 HIF-1알파(Hypoxia-inducible factor 1, alpha) 억제용 조성물.

청구항 10

제9항에 있어서, 종양, 황반변성, 당뇨, 당뇨병성 망막병증, 건선, 류마티스성 관절염, 또는 만성 염증 중에서 선택된 하나 이상의 치료, 개선 또는 예방에 효과적인 조성물.

청구항 11

제9항 내지 제10항 중 어느 한 항에 있어서, 식품 조성물 또는 약학 조성물인 조성물.

청구항 12

라폰티게닌을 유효성분으로 함유하는 종양, 황반변성, 당뇨, 당뇨병성 망막병증, 건선, 류마티스성 관절염, 또는 만성 염증 중에서 선택된 하나 이상의 치료, 개선 또는 예방용 조성물.

청구항 13

제12항에 있어서, 상기 치료, 개선 또는 예방은 신생혈관형성억제, VEGF(Vascular endothelial growth factor) 억제 또는 HIF-1알파(Hypoxia-inducible factor 1, alpha) 억제 중에서 선택된 하나 이상에 의한 것인 조성물.

청구항 14

제12항 내지 제13항 중 어느 한 항에 있어서, 식품 조성물 또는 약학 조성물인 조성물.

명세서

기술 분야

[0001] 본 발명은 신생혈관형성 억제, VEGF 억제 또는 HIF1-알파 억제용 조성물에 관한 것으로, 보다 상세하게는 라폰티게닌을 유효성분으로 함유하는 조성물에 관한 것이다.

배경 기술

[0002] 신생혈관형성(Angiogenesis)은 기존 혈관으로부터 새로운 혈관이 생성되는 기작을 의미하며, 정상적인 생리조건에서는 거의 일어나지 않는 엄격히 조절되는 현상이나 수정란 발생과정에서 배아가 발달될 때와 성인의 경우 상처가 치유될 때 그리고 여성의 생식주기에서 생식기 계통의 변화 등에서 일어난다. 성인의 경우 모세혈관의 내피세포는 상대적으로 잘 분열하지 않으며 분열속도는 보통 수개월 내지 수년이다. 혈관신생은 혈관신생은 여러 종류의 세포와 수용성 인자 및 세포외 기질(extracellular matrix) 성분과의 상호작용에 의한 복잡한 과정으로 일어난다.

[0003] 그러나 이렇게 엄격히 조절되는 현상이지만 신생혈관 형성이 과하게 진행될 경우 여러가지 질환이 유발된다. 종양에서의 신생혈관은 다른 장기로의 이동통로를 제공하여 전이가 쉽게 이루어지게 만들며, 종양뿐 아니라 연령 관련 황반변성(age-related macular degeneration), 당뇨병성 망막병증(diabetic retinopathy), 건선(psoriasis), 류마티스 관절염(rheumatoid arthritis), 만성염증(chronic inflammation)과 같은 질환에 결정적인 역할을 하는 것으로 알려져 있다. 혈관신생에 중요한 역할을 담당하는 인자로 VEGF(Vascular endothelial growth factor)가 알려져 있으며, 상기 VEGF는 HIF1-알파(Hypoxia-inducible factor 1, alpha)라는 전사조절인자에 의해 조절 가능한 것으로 알려져 있다.

[0004] 따라서, 신생혈관 억제제, HIF1-알파 억제제 및 그와 관련된 질환 또는 증세의 치료, 개선 또는 예방을 위한 기술 개발이 필요하다.

[0005] 한편, 라폰티게닌(rhapontigenin)은 신생혈관 억제, HIF1-알파 억제 및 황반변성 등과 관련성에 대해 알려지지 않았다.

발명의 내용

해결하려는 과제

[0006] 본 발명이 해결하려는 과제는 신생혈관형성억제용 조성물을 제공하는 것이다.

[0007] 또한, 본 발명이 해결하려는 과제는 VEGF 억제용 조성물을 제공하는 것이다.

[0008] 또한, 본 발명이 해결하려는 과제는 HIF-1알파 억제용 조성물을 제공하는 것이다.

[0009] 또한, 본 발명이 해결하려는 과제는 암, 연령 관련 황반변성, 당뇨병성 망막병증, 건선, 류마티스성 관절염, 또는 만성 염증 중에서 선택된 하나 이상의 치료, 개선 또는 예방용 조성물을 제공하는 것이다.

과제의 해결 수단

[0010] 본 발명은 라폰티게닌(rhapontigenin)의 신규 용도, 즉, 신생혈관형성(Angiogenesis)억제용도, VEGF(Vascular endothelial growth factor) 억제용도, HIF-1알파(Hypoxia-inducible factor 1, alpha) 억제용도 및 종양, 황반변성, 당뇨, 당뇨병성 망막병증, 건선, 류마티스성 관절염 또는 만성 염증 중에서 선택된 하나 이상의 치료, 개선 또는 예방용도를 제공한다.

[0011] 본 발명에 있어서, 라폰티게닌(IUPAC Name: 5-[(E)-2-(3-hydroxy-4-methoxyphenyl)ethenyl]benzene-1,3-diol)은 구입(예를 들어, Cayman Chemical Company, USA; Item Number : 13293)하거나 합성할 수 있다.

[0012] 상기 종양은 암일 수 있으며, 예를 들어 고형암으로 전립선암, 대장암, 유방암, 또는 섬유육종 중에서 선택된 하나 이상일 수 있다. 상기 황반변성은 연령 관련 황반변성일 수 있다.

- [0013] 또한, 본 발명은 라폰티게닌을 유효성분으로 함유하는 신생혈관형성억제용 조성물을 제공한다.
- [0014] 상기 신생혈관형성억제는 저산소 상태에서 유도되는 신생혈관 형성을 억제하는 것일 수 있다.
- [0015] 상기 신생혈관형성억제는 VEGF(Vascular endothelial growth factor) 억제 또는 HIF-1알파(Hypoxia-inducible factor 1, alpha) 억제 중에서 선택된 하나 이상에 의할 수 있다.
- [0016] 상기 조성물은 신생혈관형성억제에 의해 종양, 황반변성, 당뇨, 당뇨병성 망막병증, 건선, 류마티스성 관절염 또는 만성 염증 중에서 선택된 하나 이상의 치료, 개선 또는 예방에 효과를 나타낼 수 있다(Folkman, J. Angiogenesis in cancer, vascular, rheumatoid and other disease. Nat Med, 1:27-31,1995. 등 참조). 상기 종양은 암일 수 있으며, 예를 들어 고형암으로 전립선암, 대장암, 유방암, 또는 섬유육종 중에서 선택된 하나 이상일 수 있다. 상기 황반변성은 연령 관련 황반변성일 수 있다.
- [0017] 본 발명의 조성물은 식품 조성물 또는 약학 조성물일 수 있다.
- [0018] 또한, 본 발명은 라폰티게닌을 유효성분으로 함유하는 VEGF(Vascular endothelial growth factor) 억제용 조성물을 제공한다.
- [0019] 상기 조성물은 VEGF 억제에 의해 종양, 황반변성, 당뇨, 당뇨병성 망막병증, 건선, 류마티스성 관절염 또는 만성 염증 중에서 선택된 하나 이상의 치료, 개선 또는 예방에 효과를 나타낼 수 있다(Ferrara, N., Gerber, H. P., and LeCouter, J. The biology of VEGF and its receptors. Nat Med, 9:669-676,2003. 등 참조). 상기 종양은 암일 수 있으며, 예를 들어 고형암으로 전립선암, 대장암, 유방암, 또는 섬유육종 중에서 선택된 하나 이상일 수 있다. 상기 황반변성은 연령 관련 황반변성일 수 있다.
- [0020] 본 발명의 조성물은 식품 조성물 또는 약학 조성물일 수 있다.
- [0021] 본 발명은 라폰티게닌을 유효성분으로 함유하는 HIF-1알파(Hypoxia-inducible factor 1, alpha) 억제용 조성물을 제공한다.
- [0022] 상기 조성물은 HIF-1알파 억제에 의해 종양, 황반변성, 당뇨, 당뇨병성 망막병증, 건선, 류마티스성 관절염 또는 만성 염증 중에서 선택된 하나 이상의 치료, 개선 또는 예방에 효과를 나타낼 수 있다(Harris, A. L. Hypoxia—a key regulatory factor in tumour growth. Nat Rev Cancer, 2:38-47,2002.; Semenza, G. L. Targeting HIF-1 for cancer therapy. Nat Rev Cancer, 3:721-732,2003. 등 참조). 상기 종양은 암일 수 있으며, 예를 들어 고형암으로 전립선암, 대장암, 유방암 또는 섬유육종 중에서 선택된 하나 이상일 수 있다. 상기 황반변성은 연령 관련 황반변성일 수 있다.
- [0023] 본 발명의 조성물은 식품 조성물 또는 약학 조성물일 수 있다.
- [0024] 또한, 본 발명은 라폰티게닌을 유효성분으로 함유하는 종양, 황반변성, 당뇨, 당뇨병성 망막병증, 건선, 류마티스성 관절염 또는 만성 염증 중에서 선택된 하나 이상의 치료, 개선 또는 예방용 조성물을 제공한다. 상기 종양은 암일 수 있으며, 예를 들어 고형암으로 전립선암, 대장암, 유방암 또는 섬유육종 중에서 선택된 하나 이상일 수 있다. 상기 황반변성은 연령 관련 황반변성일 수 있다.
- [0025] 상기 치료, 개선 또는 예방은 신생혈관형성억제, VEGF(Vascular endothelial growth factor) 억제 또는 HIF-1알파(Hypoxia-inducible factor 1, alpha) 억제 중에서 선택된 하나 이상에 의할 수 있다.
- [0026] 본 발명의 조성물은 식품 조성물 또는 약학 조성물일 수 있다.
- [0027] 본 발명의 조성물은 투여를 위해서 유효성분 이외에 추가로 약학적, 및/또는 식품학적으로 허용되는 담체를 1종 이상 포함하여 제제화할 수 있다.
- [0028] 약학적 및/또는 식품학적으로 허용되는 담체는 식염수, 멸균수, 링거액, 완충 식염수, 텍스트로즈 용액, 말토덱스트린 용액, 글리세롤, 에탄올 및 이들 성분 중 하나 이상을 혼합하여 사용할 수 있으며, 필요에 따라 향산화제, 완충액, 정균제 등 다른 통상의 첨가제를 첨가할 수 있다. 또한 희석제, 분산제, 계면활성제, 용매, 봉해제, 감미제, 결합제, 피복제, 팽창제, 운환제, 활택제 또는 향미제를 부가적으로 첨가할 수 있다. 더 나아가 당 분야의 적절한 방법으로 또는 Remington's Pharmaceutical Science(최근판), Mack Publishing Company, Easton PA에 개시되어 있는 방법을 이용하여 각 질환에 따라 또는 성분에 따라 바람직하게 제제화 할 수 있다.
- [0029] 본 발명의 약학적 조성물의 제제 형태는 과립제, 산제, 정제, 피복정, 캡슐제, 좌제, 액제, 시럽, 즙, 현탁제, 유제, 점적제 또는 주사 가능한 액제 및 활성 화합물의 서방출형 제제 등이 될 수 있다.

- [0030] 본 발명의 약학적 조성물은 목적에 따라 정맥내, 동맥내, 복강내, 근육내, 흉골내, 경피, 비측내, 흡입, 국소, 직장, 경구, 안구내 또는 피내 경로 등을 통해 통상적인 방식으로 투여할 수 있다.
- [0031] 본 발명에 있어서, 유효성분의 투여량은 체중 60kg 성인기준으로 1mg/kg ~ 3.2mg/kg의 범위 내에서 조절할 수 있다. 다만, 투여될 최적의 투여량은 당업자에 의해 쉽게 결정될 수 있으며, 질환의 종류, 질환의 중증도, 조성물에 함유된 유효성분 및 다른 성분의 함량, 제형의 종류, 및 환자의 연령, 체중, 일반 건강 상태, 성별 및 식이, 투여 시간, 투여 경로 및 조성물의 분비율, 치료기간, 동시 사용되는 약물을 비롯한 다양한 인자에 따라 조절될 수 있다.
- [0032] 본 발명의 식품 조성물의 제형은 통상의 방법에 따라 제조하며, 담체와 함께 건조한 후 캡슐화하거나 기타 정제, 과립, 분말, 음료, 죽 등의 형태로 제형화할 수 있으며, 상기 기재한 것 외에도 모든 식품 형태로 제조 가능하다.
- [0033] 본 발명의 식품조성물은 건강기능식품 조성물일 수 있다.
- [0034] 본 발명의 조성물 내에서 유효성분의 함량은 조성물 총 중량에 대하여 0.3~72중량%의 양으로 함유될 수 있다.
- [0035] 또한, 본 발명은 본 발명의 조성물 중 유효성분을 투여가 필요한 인간을 포함한 포유류에게 투여하는 단계를 포함하는 신생혈관생성억제방법, VEGF(Vascular endothelial growth factor)억제방법, HIF-1알파(Hypoxia-inducible factor 1, alpha) 억제방법, 종양, 황반변성, 당뇨, 당뇨병성 망막병증, 건선, 류마티스성 관절염 또는 만성 염증 중에서 선택된 하나 이상의 치료, 개선 또는 예방법을 제공한다.
- [0036] 본 발명의 용도, 조성물 및 방법에서 언급된 사항은 서로 모순되지 않는 한 동일하게 적용된다.

발명의 효과

- [0037] 본 발명의 조성물은 함유되는 유효성분에 의해 신생혈관형성억제, VEGF 억제, HIF-1알파 억제, 및 종양, 황반변성, 당뇨, 당뇨병성 망막병증, 건선, 류마티스성 관절염 또는 만성 염증 등의 치료, 개선 또는 예방에 효과적이다.

도면의 간단한 설명

- [0038] 도 1은 시간경과에 따른 라폰티게닌의 VEGF 억제 효과를 확인한 그래프이다.
- 도 2는 라폰티게닌의 HIF-1알파 발현 억제 효과를 확인한 웨스턴 블롯 결과를 나타낸 사진이다.
- 도 3은 라폰티게닌의 HIF-1알파 발현 억제 효과를 확인한 웨스턴 블롯 결과를 나타낸 사진이다.
- 도 4는 라폰티게닌의 VEGF 억제 효과를 확인한 그래프이다.
- 도 5는 라폰티게닌의 VEGF 억제 효과를 확인한 사진이다.

발명을 실시하기 위한 구체적인 내용

- [0039] 본 발명의 이해를 돕기 위하여 실시예, 제조예를 제시한다. 하기의 실시예, 제조예는 본 발명을 보다 쉽게 이해하기 위하여 제공되는 것일 뿐, 실시예, 제조예에 의해 본 발명의 내용이 한정되는 것은 아니다.
- [0040] 하기 실시예에서 별도 언급이 없는 한, 시약은 (주)성우라이프사이언스(경기도 의정부시, 대한민국)에서 구입한 것을 사용하였다.
- [0041] 하기 실시예 중 실험결과에 대한 T-검정을 실시하여 유의차가 1% 미만 ($p < 0.01$), 0.1% 미만 ($p < 0.001$) 또는 0.01% 미만($p < 0.0001$)일 때 통계적 유의성이 있는 것으로 판정하였다.
- [0042] 각각의 도에서 *,# 는 $p < 0.01$ 이고, **,## 는 $p < 0.001$ 이며,***,### 는 $p < 0.0001$ 이다. ##,###는 정상 산소분압상태와 저산소상태에서의 VEGF발현양에 대한 유의차를 표시한다.
- [0043] <실시예 1> 라폰티게닌의 VEGF 억제 효과 확인
- [0044] 인간전립선암세포주인 PC-3(한국세포주은행, 서울, 대한민국)에 라폰티게닌(5uM 농도)을 4시간, 12시간, 24시간 동안 각각 처리 후, VEGF ELISA kit(invitrogen, USA)를 이용하여 사용설명서에 따라 VEGF 양을 측정하였다.

라폰티게닌(한국화학연구원 유시용박사팀에게서 입수함, 대전, 대한민국)은 디메틸설폭사이드에 용해된 것을 사용하였다.

[0045] 라폰티게닌을 처리하지 않은 것을 제외하고 동일하게 준비한 인간전립선암세포주를 대조군으로 사용하였다.

[0046] 그 결과를 도 1에 나타내었다. 도 1은 시간경과에 따른 라폰티게닌의 VEGF 억제 효과를 확인한 그래프로, x축은 라폰티게닌(Rha) 처리 유무(0: 무처리, 5: 5uM 농도 처리)를 나타내고, y축은 VEGF발현량(pg/ml)을 나타낸다.

[0047] 도 1에서 보는 바와 같이 시간에 따라 인간전립선암세포에서 VEGF의 발현량은 증가하며, 라폰티게닌 처리에 의해 그 발현량이 대조군에 비해 감소함을 알 수 있다. 따라서, 라폰티게닌에 의해 VEGF의 발현을 억제할 수 있으며, 그에 따라 신생혈관형성 억제, 암 등의 종양, 황반변성, 당뇨, 당뇨병성 망막병증, 건선, 류마티스성 관절염 또는 만성 염증 등 중에서 선택된 하나 이상의 치료, 개선 또는 예방 등이 가능함을 알 수 있다.

[0048] <실시예 2> 라폰티게닌의 HIF-1알파 억제 효과 확인

[0049] 저산소상태에서 발현이 증가되는 HIF-1알파가 라폰티게닌에 의해 억제되는 것을 확인하기 위하여, 인간전립선암세포주(PC-3)의 세포추출물을 이용하여 웨스턴 블롯을 수행하였다. 라폰티게닌과 인간전립선암세포주는 실시예 1에서와 동일한 방법으로 준비한 것을 사용하였다.

[0050] 인간전립선암세포(PC-3)를 지름이 100mm인 배양접시에서 정상분압상태와 저산소상태(94% N₂ / 5% CO₂ / 1% O₂)에서 각각 배양하였다. 그 후, 라폰티게닌을 1~10uM의 농도로 4시간 동안 처리한 후, 각각의 세포로부터 protease inhibitors{10 µg/ml Aprotinin, 10 µg/ml Leupeptin, 10mM Iodoacetamide, 1% PMSF(phenylmethylsulphonyl fluoride), 10 µg/ml Pepstatin A}와 phosphatase inhibitors {1mM NaF, 1mM Na₃VO₄}가 포함된 RIPA(radio immunoprecipitation assay) buffer {50mM Tris(trishydroxymethylaminomethane), 300mM NaCl, 5mM EDTA(ethylenediaminetetraacetic acid), 0.5% Triton X-100}를 사용하여 세포 용해하여 세포추출물을 준비하였다. 분리한 세포추출물 90 µg을 전기영동한 후, 겔로부터 니트로셀룰로오스 멤브레인으로 단백질을 웨스턴블롯팅(Bio-Rad, USA)을 이용하여 제조사의 사용설명서에 따라 이동시켰다. 단백질이 붙어 있는 니트로셀룰로오스 멤브레인에 HIF-1알파를 인지할 수 있는 HIF-1알파에 대한 1차 항체(BD Transduction Laboratories, USA; Catalog Number : 610958)로 섭씨 4도에서 20시간 반응시켰다. 반응이 끝나면 세척하고, 1차 항체와 결합하는 2차 항체(AbDserotec, USA; Catalog Number : STAR70)로 상온(섭씨 20도)에서 1시간 동안 반응시켰다. 이어서 2차 항체를 인지할 수 있는 용액(ECL Western blotting detection reagent, Amersham, USA)으로 2~10분간 암실에서 반응시킨 다음, X-ray 필름에 감광하여 단백질의 발현정도를 측정하였다. 이 때 동일한 필터에 대해 세포에 동일한 양으로 발현된다고 알려진 단백질인 베타-액틴에 대한 항체로 웨스턴 블롯을 수행하여, HIF-1알파의 발현량을 보정해 주었다.

[0051] 또한, 전립선암세포주 LNCap(American Type Culture Collection ATCC, USA), 대장암세포주 SW620(한국세포주은행, 서울, 대한민국), 유방암세포주 MCF-7(한국세포주은행, 서울, 대한민국), 섬유육종세포주 HT1080(한국세포주은행, 서울, 대한민국)에 대해서도 PC3세포주에서와 동일한 방법으로 처리하여 웨스턴블롯을 실시하였다.

[0052] 그 결과를 도 2와 도 3에 나타내었다. 도 2와 도 3은 라폰티게닌(Rha)의 HIF-1알파 발현 억제 효과를 확인한 웨스턴 블롯 결과를 나타낸 사진이다. 도 2와 도 3에서 '-'는 저산소상태(Hypoxia)가 아닌 상태 즉, 정상분압상태를 나타내고, '+'는 저산소상태를 나타낸다. 도 2에서 1.0, 0.9, 0.3, 0.2, 0.2는 'Image J'프로그램(National Institutes of Health, USA)을 사용하여 측정한 HIF-1α의 이미지 측정값을 숫자로 표현한 값으로, 저산소 상태에서 라폰티게닌을 처리하지 않았을 때 발현된 HIF-1α의 측정 정도를 1.0으로 기준하여, 나머지 값을 계산한 것이다. 도 2와 도 3에서 보는 바와 같이, 정상분압상태에서 배양한 암세포의 경우, HIF-1알파의 발현이 거의 되지 않으나, 저산소상태에서 배양한 암세포에서 혈관신생촉진인자인 HIF-1알파의 발현이 현저히 증가함을 알 수 있다. 또한, 도 2에서 보는 바와 같이, 라폰티게닌에 의해 농도 의존적으로 HIF-1알파의 발현이 억제됨을 확인할 수 있다. 따라서, 라폰티게닌에 의해 HIF-1알파를 억제할 수 있으며, 그에 따라 신생혈관형성 억제, 암 등의 종양, 황반변성, 당뇨, 당뇨병성 망막병증, 건선, 류마티스성 관절염 또는 만성 염증 등 중에서 선택된 하나 이상의 치료, 개선 또는 예방 등이 가능함을 알 수 있다.

[0053] <실시예 3> 저산소상태에서 발현 증가하는 VEGF 억제 효과 확인

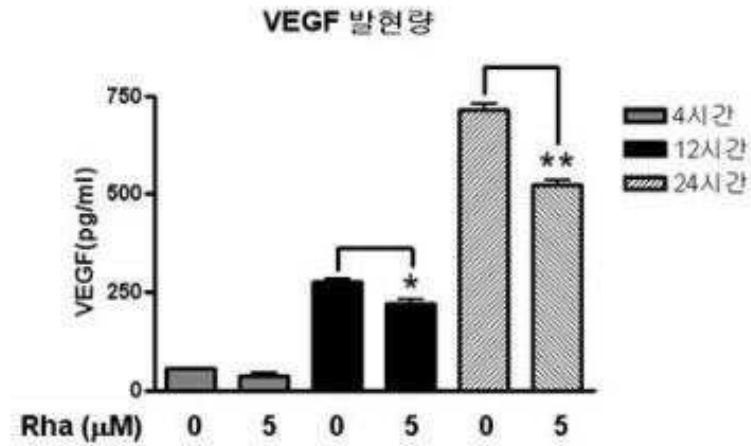
- [0054] 저산소상태에서 발현이 증가하는 VEGF가 라폰티게닌에 의해 발현이 억제되는 것을 하기 방법으로 확인하였다. 인간전립선암세포(PC-3)와 VEGF ELISA kit는 실시예 1에서와 동일한 방법으로 준비하였다.
- [0055] 인간전립선암세포를 지름이 100mm인 배양접시에서 정상분압상태와 저산소상태(94% N₂ / 5% CO₂ / 1% O₂)에서 각각 배양하였다. 그 후, 라폰티게닌을 5μM의 농도로 4, 12, 24시간 동안 처리한 후, 각각의 세포배양액을 수거하였다. 세포배양액 중 VEGF양을 VEGF ELISA kit로 제조사의 사용설명서에 따라 측정하였다. 라폰티게닌을 처리하지 않고, 정상분압상태에서 배양한 것을 제외하고 동일하게 준비한 인간전립선암세포를 대조군으로 하였다.
- [0056] 그 결과를 도 4에 나타내었다. 도 4는 라폰티게닌이 저산소상태에서 발현이 증가한 VEGF를 억제하는 효과를 확인한 그래프로, x축은 라폰티게닌(Rha) 처리 유무(0: 무처리, 5: 5μM 농도 처리)와 저산소상태 유무(-: 정상분압상태, +: 저산소상태)를 나타내고, y축은 VEGF발현량(pg/ml)을 나타낸다. 도 4는 좌측부터 우측방향으로 각각 4시간, 12시간, 24시간 처리시 결과를 나타낸다.
- [0057] 도 4에서 보는 바와 같이 시간에 따라 인간전립선암세포에서 VEGF의 발현량은 증가하며, 라폰티게닌 처리에 의해 그 발현량이 대조군에 비해 감소함을 알 수 있다. 또한, 저산소상태에서 배양한 세포의 경우 VEGF 분비량이 정상분압상태에서 배양한 세포와는 대조적으로 현저히 증가됨을 확인할 수 있으며, 이 때 라폰티게닌 처리시 VEGF의 분비량이 회복되는 것으로부터, 라폰티게닌은 저산소상태에서 유도되는 VEGF의 분비량을 감소시키는 효과를 가짐을 확인할 수 있다. 따라서, 라폰티게닌에 의해 VEGF를 억제할 수 있으며, 그에 따라 신생혈관형성 억제, 암 등의 종양, 황반변성, 당뇨, 당뇨병성 망막병증, 건선, 류마티스성 관절염 또는 만성 염증 등 중에서 선택된 하나 이상의 치료, 개선 또는 예방 등이 가능함을 알 수 있다.
- [0058] <실시예 4> 라폰티게닌의 VEGF 억제 효과 확인
- [0059] 라폰티게닌의 VEGF억제 효과를 생체 외 실험 중 가장 생체내(in vivo) 조건과 유사한 상태에서 확인하기 위해 메트리젤상의 인간제대정맥내피세포(Human Umbilical Vein Endothelial Cells; HUVEC)의 튜브 형성 실험을 실시하였다. 상기 실험은 신생혈관 형성에 있어서 특징인 튜브 형성(tube formation)에 관한 실험이다.
- [0060] 라폰티게닌은 실시예 1에서와 동일한 방법으로 준비하였다.
- [0061] 메트리젤(BD Bioscience, USA)이 코팅된 24 웰 플레이트(well plate)에 인간제대정맥내피세포(HUVECs; 경희대학교 암예방소재개발연구센터, 서울, 한국)를 분주하였다. 각각의 군으로 나누어, 일 군에 대하여 실시예 3에서와 같은 방법으로 저산소 상태(94% N₂ / 5% CO₂ / 1% O₂)에서 12시간 배양한 인간 전립선암 세포 배양액을 처리하였고, 다른 한 군에 대하여 실시예 3에서와 같은 방법으로 저산소 상태(94% N₂ / 5% CO₂ / 1% O₂)에서 라폰티게닌을 5μM의 농도로 처리하여 12시간 배양한 전립선암 세포 배양액을 처리하였다. 양성대조군에는 VEGF를 20ng/ml 처리하였다. 각 군은 정상 산소분압 상태에서 4시간 배양하였다. 그 후, 위상차 현미경을 이용하여 각각의 세포 중 튜브형성 정도를 관찰하였다. 그 결과를 도 5에 나타내었다. 도 5는 라폰티게닌의 VEGF 억제 효과를 확인한 사진으로, 좌측은 양성 대조군, 가운데는 저산소 상태 배양액 처리군, 우측은 저산소 상태에서 라폰티게닌(Rha) 처리한 배양액 처리군에 대한 결과이다. 도 5에서 보는 바와 같이 VEGF에 의해 관 형성이 뚜렷하게 만들어진 것을 관찰할 수 있으며, 저산소 상태에서 VEGF를 분비하도록 배양한 세포 배양액 처리군 역시 관모양이 형성되었음을 확인할 수 있다. 그러나, 라폰티게닌 처리한 세포 배양액 처리군의 경우 관모양 형태를 나타내지 않음을 알 수 있다. 따라서, 라폰티게닌은 신생혈관 형성을 억제함을 알 수 있으며, 바람직하게는 고형암에서와 같이 저산소상태에서 유도되는 혈관신생을 효과적으로 억제할 수 있음을 알 수 있다. 또한, 라폰티게닌에 의해 VEGF를 억제할 수 있으며, 그에 따라 암 등의 종양, 황반변성, 당뇨, 당뇨병성 망막병증, 건선, 류마티스성 관절염 또는 만성 염증 등 중에서 선택된 하나 이상의 치료, 개선 또는 예방 등이 가능함을 알 수 있다.
- [0062] <제조예 1> 약학 조성물의 제조
- [0063] 실시예 1에서와 동일한 방법으로 준비한 라폰티게닌 120mg, 옥수수 전분 100mg, 유당 100mg, 스테아린산 마그네슘 2mg을 젤라틴 캡슐에 충전하여 캡슐제를 제조하였다.
- [0064] <제조예 2> 식품 조성물의 제조

[0065]

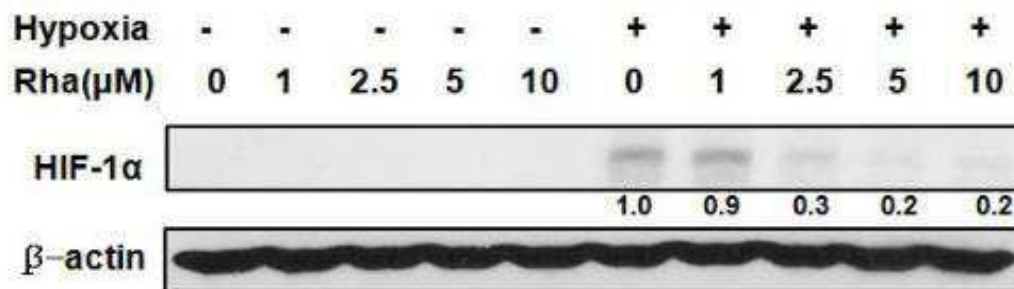
실시에 1-1에서와 동일한 방법으로 준비한 라폰티게닌(4중량 %), 액상과당(0.5중량%), 올리고당(2중량%), 설탕(2중량%), 및 식염(0.5중량%)에 물을 추가하여 잔량을 맞춘 후 균질하게 배합하여 순간 살균을 하여 건강음료를 제조하였다.

도면

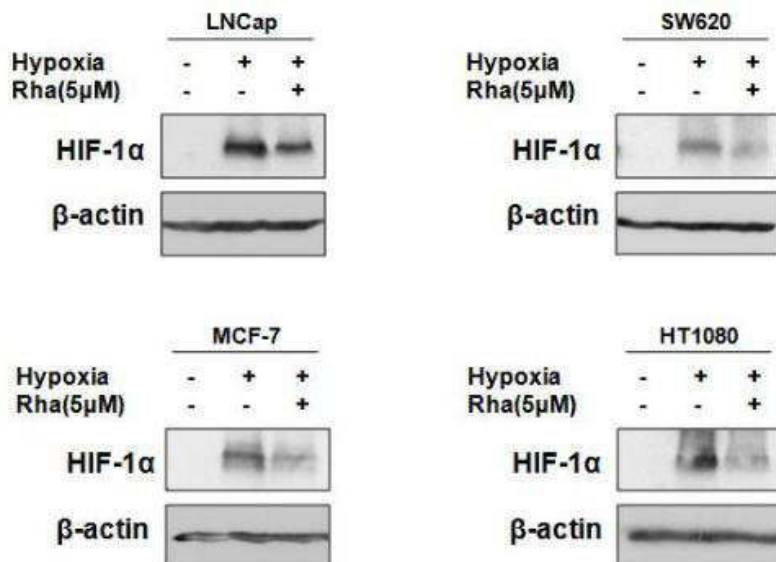
도면1



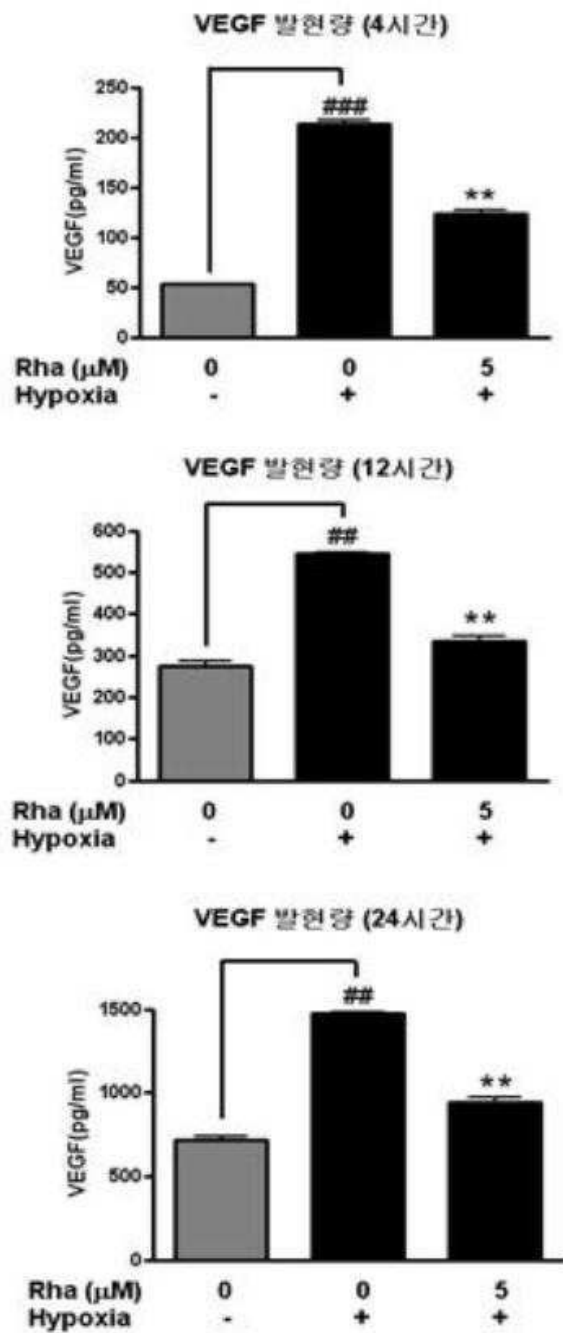
도면2



도면3



도면4



도면5

